

## **Escurecimento enzimático, compostos fenólicos totais e atividade da polifenol oxidase na polpa de cinco genótipos de Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret)**

Vanessa Samara Petry<sup>\*(1)</sup>, Rubens Onofre Nodari<sup>(2)</sup>, Daniel Ferreira Holderbaum<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Acadêmica do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>(2)</sup> Professor Titular, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>(3)</sup> Pós-Graduando em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

\*Autor correspondente – Email: vanessasamarapetry@gmail.com

### **Resumo**

O objetivo da pesquisa foi caracterizar o escurecimento enzimático e as variáveis fisiológicas relacionadas na polpa de cinco genótipos de *Acca sellowiana* (cultivares Alcântara, Helena, Mattos, Nonante e acesso B23.16) em frutos maduros da safra 2014/2015. Os frutos foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Estação Experimental da EPAGRI, em São Joaquim/SC. Por meio de ensaios espectrofotométricos, foram analisados o grau de escurecimento enzimático, teor de compostos fenólicos totais (CFT), e atividade da polifenol oxidase (PPO). Foram evidenciadas diferenças significativas entre os genótipos para todas as variáveis estudadas. Alcântara e Helena apresentaram o menor grau de escurecimento da polpa. B23.16, Nonante e Mattos apresentaram os maiores teores de CFT, enquanto Mattos e B23.16 apresentaram a maior atividade da PPO. Análises de regressão evidenciaram associações positivas significativas entre o grau de escurecimento enzimático, CFT e atividade da PPO, confirmando a influência destes fatores no escurecimento da polpa de *A. sellowiana*. Considerando os resultados deste estudo e a importância do escurecimento enzimático para o processamento de frutos, sugere-se o uso desta característica como critério de seleção em programas de melhoramento genético de feijoa.

**Palavras-chave:** germoplasma, goiabeira-serrana, melhoramento vegetal, Myrtaceae, polifenóis, processamento de frutos

## **Enzymatic browning, phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in the pulp of five genotypes of Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret)**

### **Abstract**

The objective of this research was to characterize the enzymatic browning and related physiological variables in the pulp of ripe fruits of five *Acca sellowiana* genotypes (cultivars Alcântara, Helena, Mattos, Nonante and accession B23.16). Fruits were collected at the Active Germplasm Bank of EPAGRI, in São Joaquim/SC. By means of spectrophotometric assays, the degree of enzymatic browning, the levels of total phenolic compounds (TPC), and the activity of polyphenol oxidase (PPO) in the pulp of feijoa were analyzed. Significant differences were evidenced between genotypes for all analyzed endpoints. Alcântara and Helena showed the smallest degree of browning. B23.16, Nonante and Mattos showed the highest TPC levels, while Mattos and B23.16 showed the highest PPO activity. Regression analyses evidenced significant positive associations between the degree of browning and the TPC levels and PPO activity, confirming the influence of these factors in the enzymatic browning of feijoa pulp. Considering these results and the importance of enzymatic browning for fruit processing, we suggest the use of this characteristic as selection criterion in feijoa breeding programs.

**Key words:** germplasm, pineapple-guava, plant breeding, Myrtaceae, polyphenols, fruit processing

### **Introdução**

*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. (sinonímia *Feijoa sellowiana*) é uma Myrtaceae conhecida popularmente por goiabeira-serrana ou goiabeira-do-mato e internacionalmente como feijoa. Seus frutos apresentam excelentes qualidades sensoriais e vem se destacando pelo potencial comercial, embora a espécie ainda seja pouco explorada no Brasil, de onde é nativa (MATTOS, 1986; DUCROQUET et al., 2000; SANTOS et al., 2011). Por meio de um projeto executado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em 2007 foram lançadas as primeiras cultivares brasileiras de feijoa, SCS 411-Alcântara e SCS 412-Helena, seguidas pelas cultivares SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante no ano de 2008 (DUCROQUET et al., 2007; DUCROQUET et al., 2008).

Estudos realizados com frutos de feijoa comprovaram propriedades farmacológicas da espécie, demonstrando atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante devido à sua composição química (LAPICK et al., 2005; BONTEMPO et al., 2007; ROSSI et al., 2007; WESTON, 2010; KELES et al., 2011; LIM, 2012). A feijoa pode ser consumida *in natura*, além de apresentar potencial para o beneficiamento e utilização no âmbito nutracêutico, visto que o fruto como um todo é considerado rico em compostos bioativos e antioxidantes (IELPO et al., 2000; BASILIE et al., 1997; MONFORTE et al., 2013; BELOUS, 2014). O efeito antioxidante dos compostos fenólicos por meio do consumo de alimentos funcionais se deve à atividade de eliminação direta de radicais livres presentes no organismo, prevenindo o dano oxidativo nos sistemas celulares de acordo com a estrutura química e concentração dos compostos fenólicos nos alimentos (SHAHIDI, 2004; MELO et al., 2008).

Os compostos fenólicos, ou simplesmente polifenóis, dentre os quais pode-se citar os flavonóides, as antocianinas, os taninos e as ligninas, são produtos do metabolismo secundário das plantas e apresentam uma grande diversidade química que confere a eles distintas funções nos vegetais (TAIZ & ZEIGER, 2013; IGNAT et al., 2011). Alguns compostos fenólicos podem servir como substrato para o escurecimento enzimático de tecidos lesionados em uma reação catalisada por um grupo de enzimas denominadas genericamente de polifenol oxidases (EC 1.14.18.1; EC 1.10.3.1; EC 1.10.3.2). Nas células vegetais, as polifenol oxidases situam-se nos plastídios, estando fisicamente separadas dos seus substratos fenólicos, predominantemente localizados nos vacúolos. A partir do momento que o tecido vegetal é danificado, ocorre uma perda de compartimentalização e a enzima e seus substratos entram em contato, dando início à reação de oxidação e concomitantemente ao escurecimento tecidual (DAWSON & TARPLEY, 1951; MURATA et al., 1997; PARKIN, 2010). Na presença de oxigênio molecular, a enzima polifenol oxidase (PPO) catalisa a hidroxilação de monofenóis para *o*-dihidroxi-fenóis correspondentes, e a oxidação de *o*-dihidroxi-fenóis para *o*-quinonas que então são polimerizadas dando origem a pigmentos escuros, marrons ou avermelhados (YORUK & MARSHALL, 2003). O escurecimento tecidual pode ocorrer quando os frutos e vegetais são lesionados mecanicamente durante os procedimentos de colheita, manuseio, embalagem, transporte e armazenamento dos frutos ou quando passam por beneficiamento na indústria (CHITARRA & CHITARRA, 2005; JACOMINO et al., 2008). Para a maioria dos frutos, o escurecimento dos tecidos acarreta na redução da sua qualidade, devido à

alteração de propriedades sensoriais e diminuição das propriedades nutricionais (YORUK & MARSHALL, 2003; PARKIN, 2010).

O escurecimento da polpa em *A. sellowiana* é considerado um grande desafio no aspecto de conservação pós-colheita e comercialização dos frutos, pois este distúrbio ocorre mesmo em armazenamento refrigerado (FISCHER et al., 2003; AMARANTE et al., 2013; BENINCÁ, 2014). Poucos trabalhos vêm sendo realizados neste âmbito para a feijoa no Brasil, bem como trabalhos demonstrando a existência de relação entre o escurecimento enzimático com a quantidade e qualidade de compostos fenólicos e atividade da enzima polifenol oxidase (FAN et al., 2012; AMARANTE et al., 2013; BENINCÁ et al., 2014). O interesse no aprofundamento dos estudos relacionados ao fruto de *A. sellowiana* deve-se principalmente ao potencial de exploração comercial dessa frutífera. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar o escurecimento enzimático e quantificar compostos fenólicos totais e a atividade da polifenol oxidase na polpa processada de cinco genótipos de *Acca sellowiana* no ponto de maturação dos frutos.

## **Material e métodos**

### *Caracterização da área de estudo*

Os frutos foram coletados no pomar do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Estação Experimental da EPAGRI, localizado no município de São Joaquim/SC (1415 m de altitude; 28°16'S e 49°56'W). Segundo a classificação climática de Köppen, o clima da região é Cfb (clima temperado oceânico húmido, com verão temperado), com temperatura média anual de 14 °C.

O pomar de *Acca sellowiana* é composto por aproximadamente 300 acessos, sendo a maioria procedente do estado de Santa Catarina, e outros exemplares provenientes da Nova Zelândia. As plantas são cultivadas sob as mesmas condições edafoclimáticas e conduzidas sem irrigação.

### *Material vegetal*

A colheita dos frutos foi realizada ao acaso e consistiu na seleção de frutos no 'ponto de colheita' (identificado pela facilidade de desprendimento do fruto da planta mediante toque), sem danos mecânicos ou biológicos aparentes. Os frutos foram coletados na safra 2014/2015 de três árvores (três repetições biológicas) de cinco genótipos: a) Cultivar SCS 411-Alcântara; b) Cultivar SCS 412-Helena, c) Cultivar SCS 414-Mattos, d)

Cultivar SCS 415-Nonante e e) Acesso B23.16. Após colhidos, os frutos foram encaminhados ao laboratório, higienizados com água e detergente neutro, enxaguados e, por fim, mergulhados em água destilada. Em seguida os frutos foram secos com papel toalha e acondicionados em geladeira até o momento da utilização.

#### *Análises bioquímicas*

Para cada repetição biológica do experimento foram utilizadas amostras compostas homogêneas de 8 frutos. Em cada amostra composta foram analisados os parâmetros grau de escurecimento enzimático, teor de compostos fenólicos totais e atividade de polifenol oxidase. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal e no Laboratório de Fisiologia do Metabolismo no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### *Análise do escurecimento enzimático*

Para a análise do escurecimento enzimático, foi utilizada a metodologia descrita por Coseteng e Lee (1987), com modificações. Os frutos foram cortados e a polpa foi retirada e homogeneizada em Becker com auxílio de multiprocessador doméstico (Electrolux, MixerCuisine IBE20) durante 20 s na velocidade II (3600 RPM). Em uma balança semi-analítica (Shimadzu, BL3200H) foram pesados 15 g do homogenato de polpa e adicionados 30 mL de água deionizada esterilizada, seguido de agitação por inversão durante 10 s. O homogenato foi centrifugado à 2935 g durante 15 min (Eppendorf, 5430) e 5 mL do sobrenadante foram passados para um novo tubo, onde foram adicionados 7,5 mL de álcool etílico 95 % (Synth®, PA 99,5 %) 90 min após a homogeneização. Em seguida a nova mistura foi submetida a agitação por inversão durante 10 s e centrifugação à 2935 g por 15 min. O grau de escurecimento enzimático do sobrenadante foi determinado a partir da leitura da absorbância em espectrofotômetro (BelPhotonics®, S2000 UV) no comprimento de onda de 440 nm. As análises foram realizadas em triplicatas, e o branco foi realizado com água deionizada esterilizada e álcool, na mesma proporção 1:1,5.

#### *Análise de compostos fenólicos totais*

O procedimento de extração foi baseado no método descrito por Holderbaum et al. (2010), com modificações. Em uma balança semi-analítica foram pesados 20 g do homogenato de polpa elaborado na etapa anterior e adicionados 30 mL de acetona gelada

100 % (Synth®, PA 99,5 %), seguido de agitação por inversão durante 20 s. Em seguida o homogenato foi centrifugado à 4629 g a 4 °C durante 5 min (Eppendorf, 5810R) e o sobrenadante foi transferido para novo tubo com auxílio de funil e filtro de papel (Qualy, 80g/m<sup>2</sup>). O resíduo sólido foi submetido a mais duas extrações com 20 mL de acetona gelada 80 % e uma extração final com 20 mL de acetona gelada 100 %, todas sob agitação horizontal a 100 RPM durante 10 min (Tecnal, TE-1401), seguidas de centrifugação à 4629 g a 4 °C durante 5 min e filtração com auxílio de funil e filtro de papel. O resíduo sólido foi utilizado para a preparação do pó de acetona para extração e análise da atividade da PPO. O extrato fenólico líquido obtido após as filtrações foi colocado em balão volumétrico e completado para 100 mL com água deionizada esterilizada. Após, as amostras foram acondicionadas a -20 °C até a realização das análises.

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada com base na metodologia descrita por Tuncel e Yilmaz (2013), com modificações, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu pelo método colorimétrico descrito por Singleton et al. (1999). As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (BelPhotonics®, S2000 UV), utilizando ácido gálico (Sigma-Aldrich®) como padrão. Para cada repetição foi realizada uma curva analítica com as concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mg/L de ácido gálico. Foram obtidos os seguintes coeficientes de determinação e equações:  $R_1^2=0,9784$  ( $y_1=0,117657x - 0,025143$ ),  $R_2^2=0,9989$  ( $y_2=0,106571x - 0,005762$ ) e  $R_3^2=0,9965$  ( $y_3=0,106886x - 0,004381$ ). O branco foi considerado como a solução na qual não foi adicionado ácido gálico. Para a realização das análises espectrofotométricas, alíquotas de 100 µL de amostra (ou de ácido gálico diluído para a curva analítica) foram misturadas com 5 mL de Folin-Ciocalteu (2/10) (Sigma-Aldrich®, 2N) e após 3 min foram adicionados 4 mL de Carbonato de Sódio (7,5 %) (Nuclear, Anidro PA 99 %), completando o volume para 10 mL com água deionizada esterilizada. Em seguida a mistura foi submetida à lenta agitação por inversão durante 5 s. Após duas horas de incubação das amostras no escuro, foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 765 nm, em triplicata. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE) por 100 g de massa fresca de polpa ( $\text{mg de AGE} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ MF}$ ).

#### *Análise da atividade da polifenol oxidase*

Para este ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Murata et al. (1995), com modificações. O resíduo sólido obtido da extração de compostos fenólicos totais com

acetona foi submetido à filtração à vácuo por 2 min, utilizando funil de Büchner (Chiarotti 70) e papel filtro (Unifil, 80 g/m<sup>2</sup>). Posteriormente, o resíduo sólido foi acondicionado em freezer -80 °C e então liofilizado (LioTop, L101) durante 4 h. Após a liofilização, as amostras foram pesadas e acondicionadas em freezer -80°C até o momento da análise. Para a extração da enzima, foram pesados 0,1 g de amostra e adicionados 10 mL do tampão de McIlvaine (citrato-fosfato) (pH 6,0) gelado, seguido de agitação em um agitador de tubos (Quimis, Q222B2) durante 3 min. Logo após filtração a vácuo por 2 min, o filtrado foi centrifugado (Eppendorf, 5810R) durante 30 min à 10414 g a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como extrato da PPO. A atividade da PPO foi medida com base na reação da enzima com o substrato ácido gálico, realizando a leitura da absorbância no espectrofotômetro à 420 nm. Para o ensaio foram misturados 1,6 mL de extrato da enzima, 2,0 mL de água deionizada esterilizada, e 0,4 mL de ácido gálico 10 mmol.L<sup>-1</sup>, seguindo-se à incubação a 30 °C em banho termostatizado. As leituras foram realizadas em duplicatas técnicas, aos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 minutos de incubação. A mudança de 0,001 unidade de absorbância por minuto foi considerada como uma unidade de atividade enzimática (UAE) por minuto. Os resultados foram expressos em UAE.min<sup>-1</sup>.100g<sup>-1</sup> MF (massa fresca) de polpa.

#### *Análises estatísticas*

Os dados obtidos para o grau de escurecimento enzimático e teor de compostos fenólicos totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), foi realizada a comparação de médias entre os genótipos por meio de intervalos de confiança a 95% de probabilidade (CUMMING & FINCH, 2005), empregando-se a correção de Bonferroni para comparações múltiplas dos intervalos de confiança. Para a análise da atividade da PPO foi utilizada regressão polinomial múltipla, considerando a atividade de enzima como variável dependente, e as variáveis genótipo e tempo como variáveis explicativas. Além dessas variáveis, com base em análise exploratória dos dados foi adicionado um termo quadrático para a variável tempo, visando incorporar curvatura ao modelo. Visando entender possíveis relações entre o escurecimento enzimático e o teor de polifenóis totais e a atividade da PPO, foram realizadas regressões simples correlacionando a variável grau de escurecimento enzimático com as variáveis CFT e atividade máxima da PPO, onde os dados coletados em todos os genótipos foram agrupados, obtendo-se então a resposta como tendência geral dos

genótipos). Para todas as análises, os pressupostos de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos foram verificados graficamente. As análises estatísticas foram realizadas na linguagem R (R CORE TEAM, 2014).

## **Resultados e discussão**

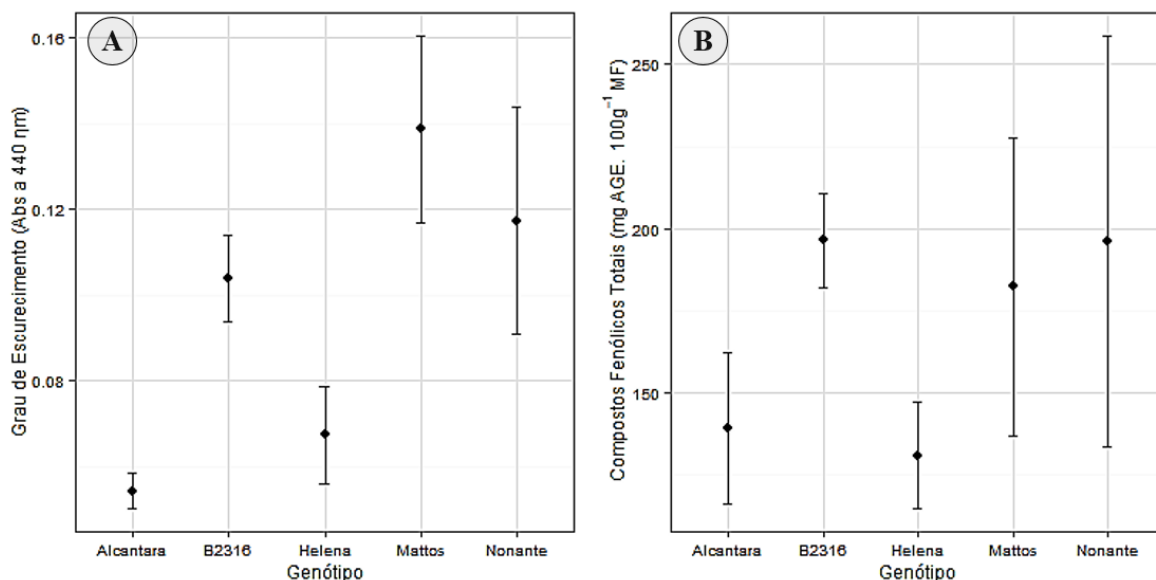
### *Análise do escurecimento enzimático*

A análise de variância apresentou diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre genótipos para o escurecimento enzimático da polpa de feijoa. (Figura 1A). As cultivares Alcântara e Helena apresentaram menor grau de escurecimento enzimático, enquanto os genótipos Mattos, Nonante e B23.16 apresentaram grau de escurecimento enzimático significativamente superior. A coloração da polpa para cada genótipo aos 0 e 90 minutos após o processo de homogeneização da polpa está ilustrada na Figura 2.

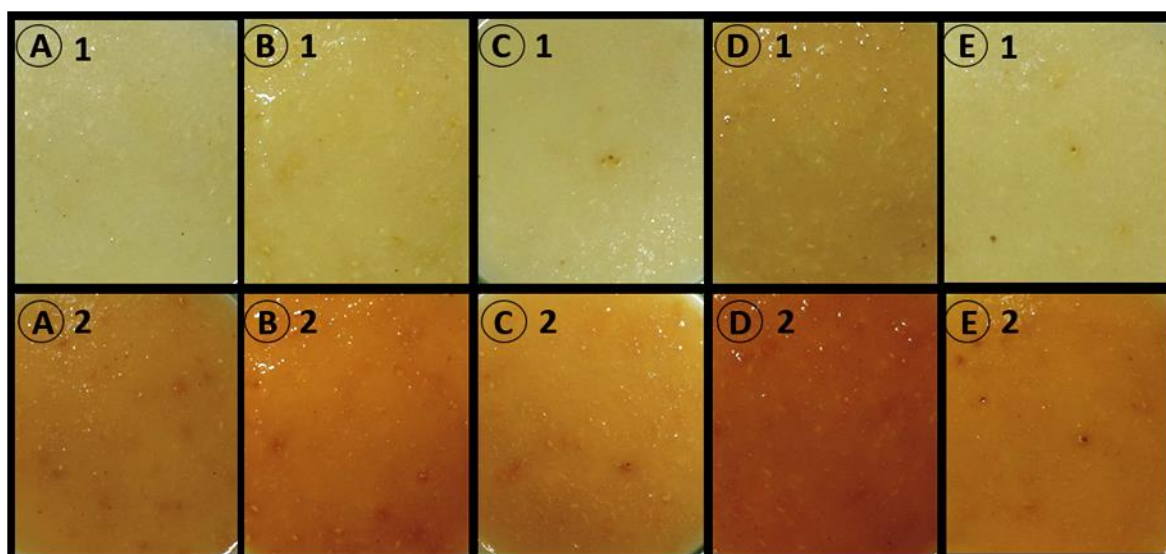
A partir de análise visual da incidência e severidade do escurecimento da polpa de feijoa após 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado (4 °C), Benincá (2014) observou diferenças significativas entre os mesmos genótipos avaliados neste estudo, entretanto o padrão de diferenças verificado foi distinto. O ponto de convergência entre os estudos é que Mattos e B23.16 se encontram entre os genótipos que apresentam o maior grau de escurecimento e Helena o menor grau. Entretanto houve divergência com relação aos resultados obtidos para Nonante, que no presente estudo obteve alto grau de escurecimento, e Alcântara que apresentou baixo grau de escurecimento, enquanto Benincá (2014) encontrou resultados opostos para estas duas cultivares. A discrepância entre os resultados deste estudo e os obtidos por Benincá (2014) pode estar relacionada com as diferenças na metodologia analítica utilizada, período de amostragem (colheita *versus* pós-colheita), bem como o tamanho amostral reduzido do presente estudo ( $n=3$ ) que diminuiu a precisão das estimativas e, conseqüentemente a detecção de diferenças.

Em programas de melhoramento de maçã, exemplo clássico de fruta suscetível ao escurecimento enzimático, a seleção de cultivares acrescenta como critério de seleção algumas características da qualidade dos frutos (LAURENS, 1999), onde as cultivares podem ser direcionadas para o consumo *in natura* devido ao seu valor nutritivo com base na quantidade e qualidade de compostos bioativos, ou podem ser direcionadas para processamento industrial devido a sua baixa tendência ao escurecimento (PODSEDEK et al., 2000).





**Figura 1.** (A) Grau de escurecimento enzimático 90 minutos após a homogeneização da polpa fresca e (B) Teor de compostos fenólicos totais na polpa fresca em cinco genótipos de *Acca sellowiana* no ponto de colheita. (Barras de erro indicam intervalos de confiança a 95% de probabilidade (n=3)).



**Figura 2.** Detalhe da coloração da polpa de cinco genótipos de *Acca sellowiana* (A=Alcântara, B=B23.16, C=Helena, D=Mattos, E=Nonante) nos tempos T1 e T2 (1=0 e 2=90 minutos após o processo de homogeneização da polpa).

#### *Análise de compostos fenólicos totais*

O resultado obtido para os teores de compostos fenólicos totais apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da variável genótipo. O acesso B23.16 apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais (196,46 mg AGE.100g<sup>-1</sup>MF - massa fresca), seguido das cultivares Nonante e Mattos (196,13 e 182,31 mg AGE.100g<sup>-1</sup> MF, respectivamente),

sendo que não foram evidenciadas diferenças significativas entre estas três cultivares (Figura 1B). As cultivares Alcântara e Helena (139,27 mg e 130,99 mg AGE.100g<sup>-1</sup>MF, respectivamente) apresentaram os menores valores de compostos fenólicos totais na polpa, apresentando diferenças significativas em relação ao acesso B23.16. É importante ressaltar que devido ao tamanho amostral relativamente pequeno (n=3), a variação nos dados foi elevada, de modo que a detecção de diferenças significativas se torna mais difícil.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram encontrados por Benincá (2014), que quantificou CFT na matéria seca de frutos inteiros (casca e polpa) dos mesmos genótipos de feijoa, evidenciando que as cultivares Nonante e Mattos (900,55 e 894,27 mg AGE.100g<sup>-1</sup>MS, respectivamente) também apresentaram maior concentração de compostos fenólicos quando comparado às cultivares Alcântara e Helena (803,89 e 699,55 mg AGE.100g<sup>-1</sup>MS, respectivamente). Entretanto, Benincá (2014) encontrou valores menores para o acesso B23.16 (724,80 mg AGE.100g<sup>-1</sup>MS) quando comparado às cultivares Mattos e Nonante no seu trabalho, o que vai de encontro aos resultados do presente trabalho. Pasquariello et al. (2015) também encontraram diferenças significativas entre outras cultivares, com valores obtidos entre 92,88 e 251,02 mg AGE.100g<sup>-1</sup> MF.

A eficiência de extração de CFT da polpa de feijoa é fortemente influenciada por diversos fatores. Tuncel e Yilmaz (2013), encontraram valores de compostos fenólicos totais da polpa dos frutos de feijoa que variam entre 767 e 1856 mg AGE.100g<sup>-1</sup> MF. Em estudo realizado por Isobe et al. (2003), a quantidade de compostos fenólicos obtida foi de 59 mg AGE.100g<sup>-1</sup> MF e, Beyhan et al. (2010) obtiveram 1768 mg AGE.100g<sup>-1</sup>MF. Riaño et al. (2014) obtiveram os valores de 682 mg AGE.100g<sup>-1</sup>MF na polpa e 417 mg AGE.100g<sup>-1</sup> MF na polpa-semente. As diferenças observadas com relação a quantidade de CFT na literatura citada (ISOBE et al., 2003; BEYHAN et al., 2010; TUNCEL & YILMAZ, 2013; BENINCÁ, 2014; RIAÑO et al., 2014; PASQUARIELLO et al., 2015) e os resultados obtidos no presente trabalho podem estar relacionadas ao processo de extração utilizado em cada estudo, à natureza dos compostos fenólicos, ao tempo e às condições de estocagem do material vegetal, ao padrão utilizado e até mesmo à presença de interferentes tais como ceras, gorduras e terpenos. Também pode estar relacionado aos fatores genotípicos e às condições ambientais que interferem no crescimento e desenvolvimento das plantas (SHAHIDI & NACZK, 1995; NACZK & SHAHIDI, 2004; FENG et al., 2014).

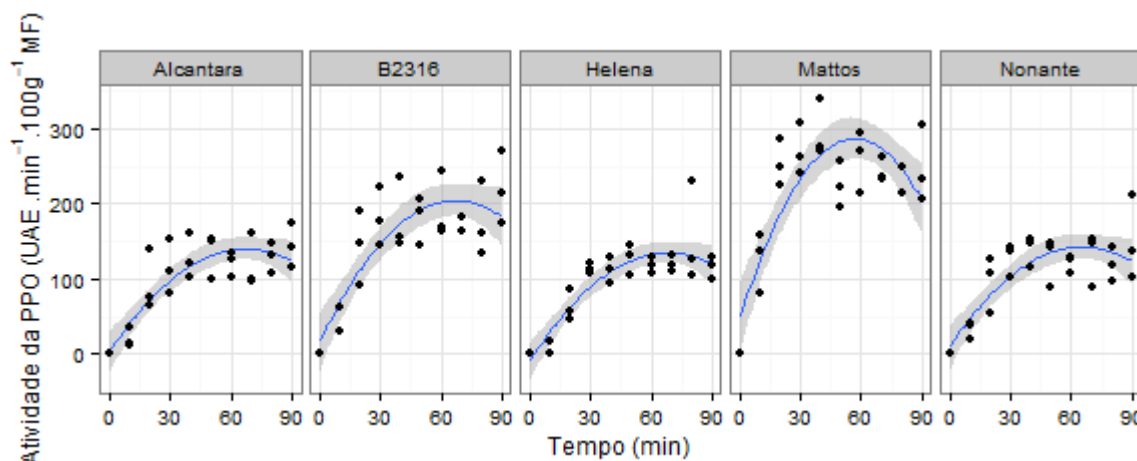
### *Análise da atividade da polifenol oxidase*

Para a atividade da PPO ficou evidenciado um efeito significativo dos diferentes genótipos ( $p < 0,001$ ). Para todos os genótipos testados, foi observada uma significativa tendência curvilínea ao longo do tempo de ensaio, sendo possível determinar a atividade máxima da PPO para cada genótipo, nas condições do presente estudo. Foram verificadas diferenças significativas nas tendências observadas para cada genótipo ao longo do tempo avaliado (Figura 3). A cultivar Mattos apresentou maior atividade da PPO, seguida de B2316, e menor atividade para as outras três cultivares, Alcântara, Helena e Nonante.

Com base em metodologia distinta utilizada para o ensaio da atividade da PPO, Benincá (2014) também evidenciou diferença significativa entre os mesmos genótipos deste estudo, com Alcântara apresentando a menor atividade da PPO. Entretanto, no presente estudo Nonante e Helena apresentaram baixa atividade da PPO, enquanto Benincá (2014) encontrou a maior atividade enzimática para estas cultivares. Este fato pode estar relacionado aos diferentes substratos utilizados e à própria referência para atividade de enzima ( $\text{UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{g}^{-1} \text{MF}$  versus  $\text{UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{proteína}$ ), bem como ao tamanho amostral reduzido no presente estudo ( $n=3$ ). Portanto, fica evidenciada a necessidade de mais estudos neste âmbito para a melhorar a caracterização da atividade enzimática da PPO na polpa de feijoa no ponto de colheita.

Em estudo realizado para caracterizar a atividade da PPO em feijoa, Fan et al. (2012) observaram que pH 6,0 e temperatura a 30 °C foram as condições ideais para o ensaio da atividade da PPO, porém utilizando catecol como substrato. O resultado obtido a partir das condições ideais evidenciou um incremento basicamente linear nos primeiros seis minutos demonstrando atividade estável, seguindo de incremento exponencial e estabilização alcançando o máximo de atividade aos 35 minutos (FAN et al., 2012). Porém nas condições do presente estudo, a atividade máxima foi verificada em média após os 50 minutos (Figura 3), o que pode estar relacionado à uma menor afinidade entre a PPO de feijoa e o ácido gálico, em comparação ao catecol, utilizado por Fan et al. (2012).

Os resultados do presente estudo constituem a primeira quantificação da atividade da PPO na polpa de *Acca sellowiana* a partir de extrato de pó de acetona, bem como ilustram a adequação do método para a análise e diferenciação entre genótipos. A utilização desta metodologia apresenta vantagem, pois durante a preparação do pó é possível obter o extrato fenólico que é utilizado nas análises de CFT.



**Figura 3.** Atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) ( $\text{UAE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{MF}$ ) em ensaio com o substrato ácido gálico ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), observada em extratos de frutos de cinco genótipos de *Acca sellowiana* (Bandas acinzentadas indicam envelopes de confiança a 95% de probabilidade).

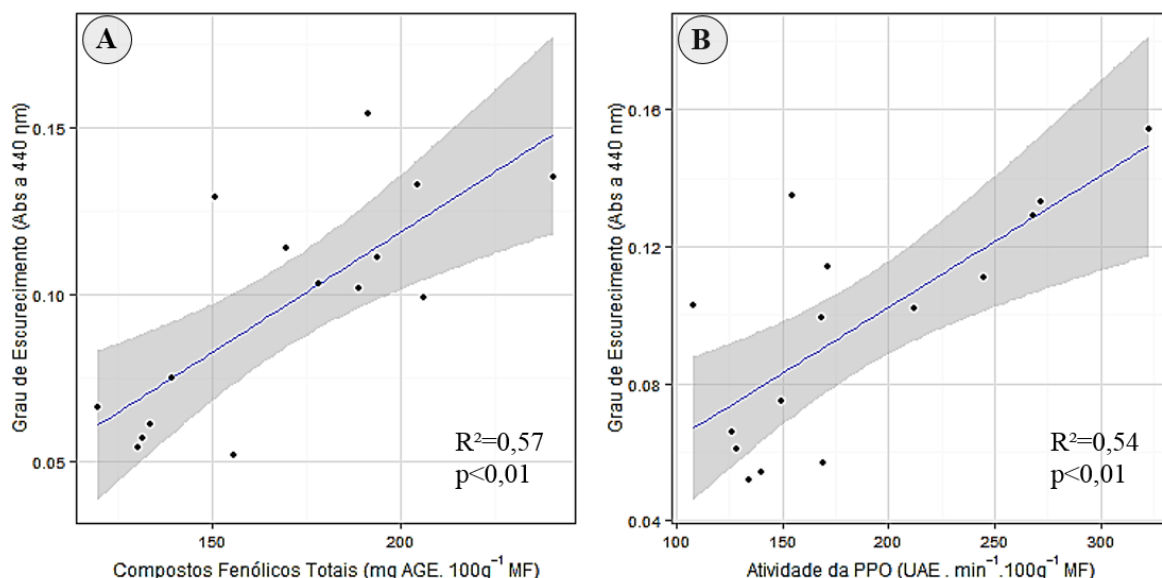
#### *Efeitos do teor de compostos fenólicos totais e da atividade máxima de PPO no escurecimento enzimático da polpa de feijoa*

A partir da análise de regressão do escurecimento enzimático em função de CFT, foi constatado um efeito significativo do teor de CFT no escurecimento da polpa de feijoa ( $p < 0,01$ ). O coeficiente de determinação alcançado ( $R^2$ ) foi de 0,57, indicando que a variação no teor de CFT explicou 57 % da variação no escurecimento enzimático. A análise ainda indicou como tendência geral que a relação entre as variáveis é positiva. Assim, à medida em que a quantidade de polifenóis totais aumenta também há um acréscimo no grau de escurecimento (Figura 4A). Este resultado, pioneiro para cultivares brasileiras de *A. sellowiana*, corrobora com estudos realizados com outras frutas, como por exemplo a maçã, para a qual ficou evidenciado a influência dos compostos fenólicos sobre o potencial de escurecimento na polpa (COSETENG & LEE, 1987; MURATA et al., 1995; HOLDERBAUM et al., 2010). Esta relação pode ser explicada pelo fato de que a reação do escurecimento é consequência da oxidação dos compostos fenólicos catalisada por PPOs, que originam quinonas que então são polimerizadas com outras quinonas ou fenólicos, originando assim os pigmentos escuros que caracterizam o escurecimento enzimático (MARSHALL et al., 2000).

Para a análise de regressão do escurecimento enzimático em função da atividade máxima da PPO, foi verificado um efeito significativo ( $p < 0,01$ ) da máxima atividade da enzima PPO sobre o grau de escurecimento enzimático. O coeficiente de determinação alcançado ( $R^2$ ) foi de 0,54, indicando que 54 % da variação no grau de escurecimento

enzimático foi explicada pelo nível máximo alcançado de atividade da PPO. Constatou-se ainda como tendência geral que a relação entre as variáveis foi positiva. Desta forma, quanto maior a atividade da PPO, maior o grau de escurecimento (Figura 4B). Segundo Thorp e Bielecki (2002), existe uma correlação positiva entre os níveis de atividade da enzima PPO e o escurecimento de polpa de feijoa, o que também foi verificado no presente estudo. Benincá (2014) também verificou uma relação entre a suscetibilidade ao escurecimento de polpa em genótipos de feijoa com a atividade da PPO, durante o armazenamento dos frutos, porém não comprovou estatisticamente esta relação. Em abacaxi, os resultados demonstraram que o aumento da atividade da PPO está diretamente relacionado ao escurecimento interno dos frutos durante o período de armazenamento (ZHOU et al., 2003).

Sabe-se que a tendência ao escurecimento dos tecidos na maioria das frutas e vegetais pode estar relacionada com a atividade da PPO (MARSHALL et al., 2000) e que alguns fatores determinam a intensidade de escurecimento, como: atividade da enzima, concentração e disponibilidade de substrato, disponibilidade de oxigênio, temperatura, atividade de água e pH (JACOMINO et al., 2008; PARKIN, 2010). E, por sua vez, a preferência de substratos é dependente da fonte e isoforma da enzima (PARKIN, 2010). Apesar da importância, as causas do escurecimento na polpa de *A. sellowiana* ainda são pouco conhecidas e poucos trabalhos foram realizados para feijoa no contexto da análise do escurecimento enzimático da polpa no ponto de colheita. Sendo assim, sugere-se a necessidade de mais estudos neste âmbito, pois encontrar cultivares que apresentem uma menor atividade enzimática é de grande relevância, visto que quanto maior a atividade da enzima, maior tende a ser o grau de escurecimento enzimático, o que poderá acarretar em mudanças sensoriais e nutricionais indesejáveis com maior rapidez (YORUK & MARSHALL, 2003; PARKIN, 2010). Vale ressaltar, por fim, que este estudo evidenciou que tanto o teor de CFT quanto a atividade de PPO explicaram cerca de 50% da variação observada para o escurecimento enzimático da polpa de feijoa, indicando que estes fatores podem ter níveis de influência semelhantes no processo de escurecimento da polpa de feijoa.



**Figura 4.** Influência dos parâmetros bioquímicos Compostos Fenólicos Totais e Atividade máxima da Polifenoloxidase no escurecimento enzimático da polpa de *Acca sellowiana*. (A) Regressão entre quantidade de compostos fenólicos totais e grau de escurecimento para os cinco genótipos de *A. sellowiana* agrupados; (B) Regressão entre a atividade da polifenol oxidase e o grau de escurecimento para os cinco genótipos de *A. sellowiana* agrupados. (Bandas acinzentadas indicam intervalos de confiança a 95% de probabilidade).

## Conclusões

Foi verificada a variabilidade do germoplasma estudado com relação ao grau de escurecimento enzimático da polpa de feijoa, à quantidade de compostos fenólicos totais e à atividade da PPO. As cultivares Helena e Alcântara apresentaram os menores níveis de escurecimento enzimático, associados à uma menor atividade da PPO e menor teor de compostos fenólicos totais. O Acesso B23.16 e as cultivares Nonante e Mattos apresentaram maior grau de escurecimento enzimático, associado a um maior conteúdo de compostos fenólicos totais e à elevada atividade da enzima PPO. Estes resultados, bem como estudos futuros sobre o tema, poderão auxiliar na seleção e indicação de cultivares prioritárias para o consumo *in natura*, devido a um maior conteúdo de compostos fenólicos no ponto de colheita comercial, bem como de cultivares propícias ao processamento devido ao baixo grau de escurecimento enzimático da polpa. Por fim, fica clara a importância da caracterização e conservação de germoplasma de feijoa com o objetivo de se alcançar novos objetivos para o melhoramento genético, de modo a explorar ao máximo o potencial desta frutífera nativa da região sul do Brasil.

## Referências

- AMARANTE, C.V.T. et al. Qualidade e potencial de conservação pós-colheita dos frutos em cultivares brasileiras de goiabeira-serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 35, n. 4, p. 990-999, 2013.
- BASILE, A. et al. Antibacterial activity in *Actinidia chinensis*, *Feijoa sellowiana* and *Aberia caffra*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 8, n. 3, p. 199–203, 1997.
- BELOUS, O.; OMAROV, M.; OMAROVA, Z. Chemical composition of fruits of a feijoa (*F. Sellowiana*) in the conditions of subtropics of Russia. **Potravinarstvo® Scientific Journal for Food Industry**, v. 8, n. 1, p. 119-123, 2014.
- BENINCÁ, T.D.T. **Pós-colheita de goiabeira-serrana: enzimas ligadas ao escurecimento de polpa, revestimentos comestíveis e compostos bioativos**. 2014. 125 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages – SC, 2014.
- BEYHAN, O.; ELMASTAS, M.; GEDIKLI, F. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 11, p. 1065-1072, 4 jun. 2010.
- BONTEMPO, P. et al. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1902–1914, 2007.
- CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: Editora da UFLA, 2005. 783p.
- COSSETENG, M.Y.; LEE, C.Y. Changes in Apple Polyphenoloxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 4, p. 985-989, 1987.
- CUMMING, G.; FINCH, S. Inference by Eye – Confidence Intervals and How to Read Pictures of Data. **American Psychologist**, v. 60, p. 170-180, 2005.
- DAWSON, C.R.; TARPLEY, W.B. The copper oxidases. In: SUMNER, J.B.; MYRBÄCK, K. **The Enzymes**. 1. ed., v. 2. New York: Academic Press, 1951.
- DUCROQUET, J.P.H.J. et al. As primeiras cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 411 Alcântara e SCS 412 Helena. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, p. 77-80, 2007.
- DUCROQUET, J.P.H.J. et al. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414-Mattos e SCS 415-Nonante. **Agropecuária Catarinense**, v. 21, p. 79-82, 2008.
- DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E.R.; NODARI, R.O. **Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana*)**. Série frutas nativas 5. Jaboticabal: Funep, 2000. 66p.
- FAN, L.Z. et al. Characterization of Polyphenol Oxidase from Feijoa Fruit. **Agricultural Journal**, v. 7, p. 323-326, 2012.

FENG, F. et al. Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (*Malus X domestica*) cultivars. **Horticulture Research**, v. 1, 2014.

FISCHER, G. et al. **Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (*Acca sellowiana* Berg)**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2003. 152 p.

HOLDERBAUM, D.F. et al. Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development. **HortScience**, v. 45, n. 8, p. 1150-1154, 2010.

IELPO, M.T.L. et al. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 71, p. 101-109, 2000.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

ISOBE, Y. et al. Antioxidative activity of tropical fruit, *Feijoa sellowiana* Berg. **Journal of Home Economics of Japan**, v. 54, n. 11, p. 945-949, 2003.

JACOMINO, A.P. et al. Transformações Bioquímicas em Produtos Hortícolas após a Colheita. In.: KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242 p.

KELES, H. et al. The effects of *Feijoa sellowiana* fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n.3, p. 318-325, 2012.

LAPCÍK, O. et al. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 1, p. 983-992, 2005.

LAURENS, F. Review of the current apple breeding programmes in the world: Objectives for scion cultivar improvement. In: TOBUTT, K.R.; F.H. ALSTON. Proc. Eucarpia Symposium on Fruit Breeding Genetics. **Acta Horticulture**. 484, p. 163-170, 1999.

LIM, T.K. **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants**. Springer, 2012.

MARSHALL, M.R.; KIM, J.M.; WEI, C.I. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. **Food and Agricultural Organization**, v. 41, p. 259-312, 2000.

MATTOS, J.R. **A goiabeira-serrana**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis (publicação IPRNR, 19), 1986. 84p.

MELO, E.A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 193-201, 2008.



MONFORTE, M.T. et al. *Feijoa sellowiana* Berg Fruit Juice: Anti-Inflammatory Effect and Activity on Superoxide Anion Generation. **Journal of Medicine Food**, v. 17, n. 4, p. 455-461, 2014.

MURATA, M.; NODA, I.; HOMMA, S. Enzymatic Browning of Apples on the Market: Relationship between Browning, Polyphenol Content, and Polyphenol Oxidase. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 42, n. 10, p. 820-826, 1995.

MURATA, M. et al. Subcellular Location of Polyphenol Oxidase in Apples. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 1495-1499, 1997.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

PARKIN, K.L. Enzimas. In.: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

PASQUARIELLO, M. S. et al. Agronomic, nutraceutical and molecular variability of feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) germplasm. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 1-9, 2015.

PODSEDEK, A. et al. Compositional characterization of some apple varieties. **European Food Research and Technology**, v. 210, p. 268-272, 2000.

R CORE TEAM, R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. <<http://www.R-project.org/>>.

RIANÑO, A.M.S. et al. Efecto del Solvente de Extracción Sobre la Actividad Antioxidante de Feijoa. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 67, n. 2, p. 681-683.

ROSSI, A. et al. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by an Acetonic Extract from *Feijoa sellowiana* Berg. Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5053-5061, 2007.

SANTOS, K.L. et al. **Orientações para o cultivo da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*)**. Florianópolis: EPAGRI, 2011. 44p. (Boletim Técnico, 153).

SHAHIDI, F. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. 146-149, 2004.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

THORP, G.; BIELESKI, R. **Feijoas: Origins, Cultivation and Uses**. HortResearch. Ed. David Bateman, 2002. 87p.

TUNCEL, N.B.; YILMAZ, N. Optimizing the extraction of phenolics and antioxidants from feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n.1, p. 141-150. 2013.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 21, p. 49-127, 1981.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. et al. The role of enzyme substrate ratio in the enzymatic browning of fruit tissue homogenates. **Acta Alimentaria**, v. 6, p. 379-388, 1977.

WESTON, R.J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v. 121, p. 923-926, 2010.

YORUK, R.; MARSHALL, M.R. Physicochemical Properties and Function of Plant Polyphenol Oxidase: A Review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 361-422, 2003.

ZHOU, Y. et al. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. **Food Chemistry**, v. 80, p. 565-572, 2003.